

冬凌草甲素通过线粒体途径诱导人胆囊癌 GBC - SD 细胞凋亡

丁笑笑 罗文达 张 佳 洪 叶 冯长伟

摘 要 **目的** 研究冬凌草甲素诱导人胆囊癌 GBC - SD 细胞的凋亡作用及其机制。**方法** MTS 法检测冬凌草甲素对 GBC - SD 细胞的生长抑制作用;瑞氏染色法观察细胞的形态学变化;流式细胞仪检测细胞凋亡率、线粒体膜电位改变、caspase - 3 活性变化;Western blot 检测 caspase - 9 活化情况。**结果** 冬凌草甲素能显著抑制 GBC - SD 细胞增殖,呈时间剂量依赖性($P < 0.05$)。细胞形态学观察可见冬凌草甲素可诱导细胞发生凋亡。流式细胞仪检测结果显示 28 $\mu\text{mol/L}$ 药物处理 GBC - SD 细胞 24h 后,细胞凋亡率为 $51.28\% \pm 2.65\%$ 。随着药物浓度增加,GBC - SD 细胞线粒体膜电位逐渐下降而 caspase - 3 活性逐渐增强,56 $\mu\text{mol/L}$ 组 caspase - 3 活性是对照组的 11 倍。Western blot 分析结果显示 caspase - 9 酶原被激活,且活化条带随药物浓度的增加而增强。**结论** 冬凌草甲素可能通过细胞线粒体膜电位下降激活 caspase - 3 并最终诱导 GBC - SD 细胞凋亡。

关键词 冬凌草甲素 GBC - SD 细胞 细胞凋亡 线粒体 caspase - 3

Oridonin - induced GBC - SD Cell Apoptosis through Mitochondrial Pathway. Ding Xiaoxiao, Luo Wenda, Zhang Jia, Hong Ye, Feng Changwei. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** To study the mechanisms of apoptosis of human gallbladder carcinoma GBC - SD cell induced by oridonin and the role of mitochondrial pathway in the apoptotic process. **Methods** MTS assay was used to examine the oridonin - induced growth inhibition of human gallbladder carcinoma GBC - SD cell. Wright's staining was used to observe the cell morphologic changes of apoptosis induced by oridonin. With a kind of double - dye assay of Annexin V + /PI, the rates of apoptotic cell were detected next to flow cytometry. Similarly, the mitochondria membrane potential and positive rate of caspase - 3 was also detected by flow cytometry. The expression of caspase - 9 was detected by Western blot. **Results** Oridonin obviously inhibited the growth of GBC - SD cells in a time - and dose - dependent manners. Morphological changes indicated that oridonin induced GBC - SD cells apoptosis. Flow cytometry revealed the apoptosis rate values of 28 $\mu\text{mol/L}$ oridonin 24h after administration were $51.28\% \pm 2.65\%$. The mitochondrial membrane potential of GBC - SD cells gradually decreased while caspase - 3 activity gradually increased with the increase concentration of oridonin. The activity of caspase - 3 was increased after treatment with oridonin (56 $\mu\text{mol/L}$) about 11 times as much as the control value. Caspase - 9 zymogen was activated according to Western blot analysis. **Conclusion** Oridonin could induce GBC - SD cells apoptosis by the mechanism of mitochondrial - regulated caspase pathway.

Key words Oridonin; GBC - SD cell; Apoptosis; Mitochondria; Caspase - 3

冬凌草甲素(oridonin)是从冬凌草中分离出来的一种贝壳杉烯二萜类(ent - kaurene diter - penoid)天然有机化合物^[1]。国内外多项研究发现冬凌草甲素能显著抑制多种肿瘤细胞株的生长,并诱导细胞凋亡。但对人胆囊癌细胞系 GBC - SD 细胞体外的作用及机制,目前尚不完全明了。本研究以人胆囊癌细胞系 GBC - SD 细胞为研究对象,观察冬凌草甲素对 GBC - SD 细胞增殖的抑制作用,并探讨其诱导 GBC

- SD 细胞凋亡的相关机制。

材料与方法

1. 细胞系:人胆囊癌 GBC - SD 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。(2)药物及试剂:冬凌草甲素由中国生物制品检定所提供,纯度 > 98%,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,0.22 μm 尼龙滤膜过滤除菌, - 20℃ 避光保存。Annexin - V - FITC/PI、caspase - 3 - FITC 购自 Biovision 公司。caspase - 9 试剂盒购自 EPITOMICS 公司。RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司。特级胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司。(3)仪器:CO₂ 细胞培养箱(Forma 3111 型)。倒置显微镜(Olympus IX70)。荧光显微镜(Zeiss AxioStar Plus)。高速冷冻离心机(Heraeus Multifuge 3s - r)。超净工作台(苏州苏净公司)。FACS caliber 流式细胞仪(美国 BD 公司)。超低温冰箱

(Thermo forma 725)等。

2. 方法: (1) 细胞培养: GBC-SD 细胞由含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养, 平均 2 天传代 1 次, 实验使用细胞均为接种后 24h 处于对数生长期细胞。 (2) 细胞增殖抑制测定: 采用 MTS 法进行检测。收集对数生长期的 GBC-SD 细胞。调整细胞浓度 5×10^4 /ml。分装于 5 个培养瓶中。加入冬凌草甲素使其终浓度分别为 7、14、28、56 μmol/L。取 96 孔培养板 5 个, 每板每孔加入上述细胞悬液 200 μl 每种药物浓度为 1 组, 每组设 3 个平行孔, 并设对应的空白孔 (不加细胞和药) 和对照孔 (不加药), 放入 CO₂ 孵箱, 分别培养 12、24、48h 后, 每孔加入 MTS 溶液 20 μl, 37℃ 继续孵育 2~4h, 终止培养, 用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其 OD 值。计算细胞生长抑制率 (inhibit rate, IR) = [(对照组 OD 值 - 药物组 OD 值) / 对照组 OD 均值] × 100%。半数抑制浓度 (IC₅₀) 采用 Logit 法计算。 (3) 细胞凋亡的形态学观察: 根据细胞增殖抑制测定结果, 选取冬凌草甲素抑制率最高的药物浓度 56 μmol/L, 同时设空白对照。取对数生长期的 GBC-SD 细胞, 调整细胞浓度为 5×10^4 /ml, 接种于培养瓶中至细胞完全贴壁后用上述药物处理, 置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24h 后观察活细胞形态变化, 并离心洗涤, 制备细胞涂片, 干燥后瑞氏-姬姆萨染色, 荧光显微镜下观察细胞核变化。 (4) 流式细胞仪检测细胞凋亡、caspase-3 活化率及线粒体膜电位改变: 取对数生长期的 GBC-SD 细胞, 每孔 2ml 接种于 6 孔板中, 实验设对照组和冬凌草甲素组, 均设 2 个复孔。待细胞贴壁后, 加入冬凌草甲素使其终浓度分别为 7、14、28、56 μmol/L, 作用 24h 后收集细胞, 800r/min 离心 5min, 弃去培养液, PBS 洗 2 次。 ① Annexin V 检测: 按 Avnnextin V - FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书, 收集处理后的 GBC-SD 细胞, 悬浮在 200 μl 染色缓冲液中, 各加 5 μl Avnnextin V - FITC, 避光室温放置 15min 后, 再加 2 μl PI 溶液, 上机检测细胞凋亡率; ② caspase-3 活化率检测: 按 caspase-3 试剂盒说明操作, 收集各组细胞后, PBS 洗涤, 0.5ml PBS 重悬, 800r/min 离心 6min, 弃上清, 加入 0.3ml wash buffer 重悬, 加入 1 μl FITC - DEVD - FMK, 37℃、5% CO₂ 温箱 1h, 3000r/min 离心 5min, 弃上清, 加入 0.5ml wash buffer, 3000r/min 离心 5min, 弃上清, 0.5ml wash buffer 重悬, 上机检测; ③ 线粒体膜电位检测: 按线粒体膜电位检测说明书进行以下实验: 收集各组细胞后每管加罗丹明 1.25 μl 充分混匀, 37℃ 水浴 5min, 20000r/min 离心 5min, 弃上清, PBS 0.5ml 重悬, 移入流式管, 上机检测。 (5) 蛋白印记 (Western blot) 检测 caspase-9 活化水平: 离心收集冬凌草甲素作用前后的 GBC-SD 细胞; 裂解细胞, 提取蛋白, 并测定蛋白浓度; 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 每个泳道加 20~40 μg 样品蛋白, 浓缩胶上所加电压为 8V/cm。当蛋白进入分离胶后, 把电压提高到 15V/cm, 电泳 2h; 转膜; 3% BSA 封闭 2h; 抗原抗体反应: 一抗封闭 4℃ 过夜, 二抗封闭 2h; DAB 显色并扫描留存结果。

3. 统计学方法: 统计分析使用 SPSS 17.0 软件包进行处

理。所有实验均至少重复 3 次, 实验结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本间均数比较采用方差分析, 多组间两两比较采用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 冬凌草甲素对人胆囊癌 GBC-SD 细胞的生长抑制作用: MTS 法检测结果显示冬凌草甲素能明显抑制各组细胞生长 (图 1)。冬凌草甲素对细胞生长抑制作用随着药物浓度增加和作用时间延长逐渐增强, 且各组与对照组相比差异均有统计学意义 (P < 0.05), 呈浓度和时间依赖性。24h IC₅₀ 值为 20.41 μmol/L。

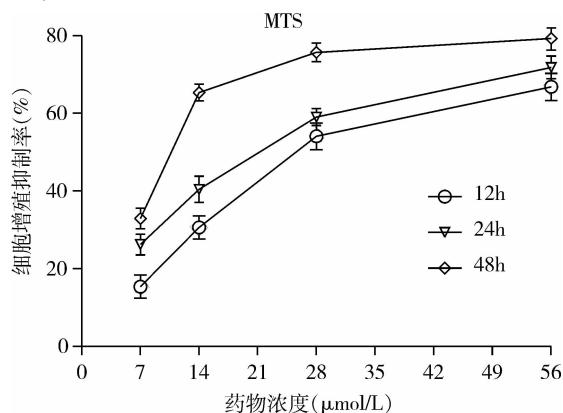


图 1 冬凌草甲素对 GBC-SD 细胞的生长抑制作用 (n = 3)

2. GBC-SD 细胞的形态学改变: 细胞呈贴壁生长, 细胞排列密集, 大小均一, 形态呈多边形、纺锤形, 包膜完整, 折光性好, 细胞核染成深蓝色或蓝紫色, 色泽均一 (图 2)。56 μmol/L 冬凌草甲素作用 GBC-SD 细胞 24h 后, 倒置显微镜下可见贴壁细胞减少, 细胞体积变小, 变圆, 细胞核染色质边移、浓缩, 细胞核固缩成圆形, 破碎, 染色变深, 胞质明显增多, 形成凋亡小体。

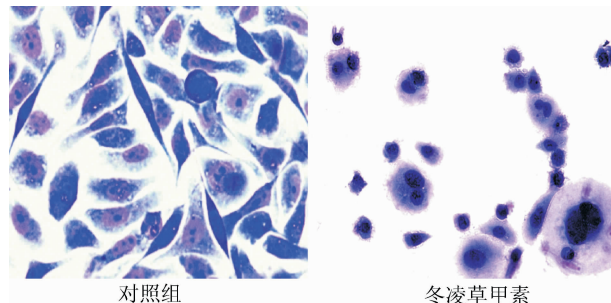


图 2 冬凌草甲素对 GBC-SD 细胞形态的影响
Giemsa, × 200

3. 细胞凋亡检测结果: 7、14、28、56 μmol/L

冬凌草甲素作用于 GBC - SD 细胞 24h 后,细胞凋亡率随着药物浓度增加而逐渐升高。流式细胞仪测得细胞凋亡率(早期凋亡率 + 晚期凋亡率)分别为 $5.81\% \pm 1.86\%$, $17.63\% \pm 1.47\%$, $26.05\% \pm 4.12\%$, $51.28\% \pm 2.65\%$, $92.63\% \pm 3.07\%$, 分别与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图 3。

4. 线粒体膜电位、caspase - 3 活性改变:7、14、28、56 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素作用于 GBC - SD 细胞 24h 后,流式细胞仪测得 GBC - SD 细胞线粒体膜电位均有不同程度下降,且膜电位随着药物浓度增加而降低,与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明冬凌草甲素可降低 GBC - SD 细胞线粒体膜电位。同时检测到caspase - 3活性随着药物浓度增加

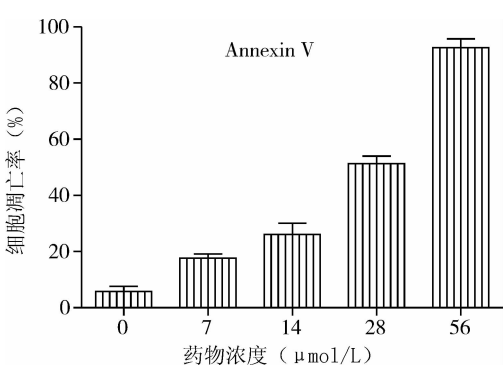


图 3 冬凌草甲素对 GBC - SD 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

逐渐增强,56 $\mu\text{mol/L}$ 组 caspase - 3 活性是对照组的 11 倍(表 1)。

表 1 冬凌草甲素对 GBC - SD 细胞线粒体膜电位及 caspase - 3 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	对照组	7 $\mu\text{mol/L}$	14 $\mu\text{mol/L}$	28 $\mu\text{mol/L}$	56 $\mu\text{mol/L}$
线粒体膜电位	7.30 $\pm$ 2.64	50.83 $\pm$ 4.13	59.96 $\pm$ 2.07	67.52 $\pm$ 2.66	76.26 $\pm$ 2.80
caspase - 3 活性	7.88 $\pm$ 2.05	24.21 $\pm$ 2.48	30.28 $\pm$ 2.50	52.12 $\pm$ 2.60	93.27 $\pm$ 3.83

5. caspase - 9 表达水平的变化:7、14、28、56 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素作用于 GBC - SD 细胞 24h 后 Western blot 检测 caspase - 9 表达水平的变化,结果显示随着药物浓度的增加,caspase - 9 逐渐被活化出现 37kDa 条带,且活化条带随药物浓度的增加而增强(图 4)。

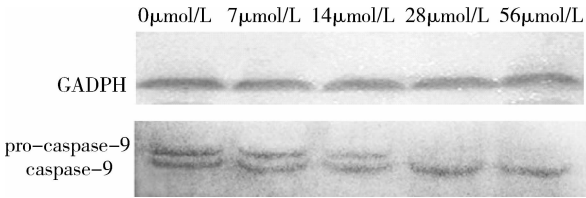


图 4 冬凌草甲素对 GBC - SD 细胞 caspase - 9 表达的影响

讨 论

近年来,中药抗肿瘤治疗研究已成为肿瘤治疗领域的热点。冬凌草甲素是从中药冬凌草中提取出来的抗肿瘤单体化合物,具有广泛的生物学活性。国内外学者对冬凌草甲素进行了深入研究,其抗肿瘤效应已在多个体外实验中得到验证^[2-7]。本研究以人胆囊癌细胞系 GBC - SD 细胞为研究对象,观察了冬凌草甲素对 GBC - SD 细胞的增殖抑制作用,研究结果表明,冬凌草甲素能明显抑制 GBC - SD 细胞的增殖,诱导细胞发生凋亡,呈时间和剂量依赖关系。

56 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素作用细胞 24h 后,细胞形态发生明显改变,同时检测到该药物组在诱导细胞凋亡过程中,GBC - SD 细胞线粒体膜电位下降了 90%,这在既往研究中尚未见报道。

目前认为,线粒体是真核细胞能量代谢的中心,具有氧化磷酸化、传递电子、抗活性氧化等重要生理作用,在细胞凋亡中起着中心调控作用^[8]。谢晓原等^[9]报道冬凌草甲素通过线粒体途径诱导人食管癌细胞株凋亡。季宇彬等^[10]研究发现冬凌草甲素注射剂可降低人胃癌 SGC - 7901 细胞的线粒体膜电位。有研究表明,细胞凋亡过程中 caspase(半胱氨酸 - 天冬氨酸蛋白酶)激活因子的释放与线粒体密切相关^[11, 12]。caspase 通常以结构酶原形式广泛存在于细胞,在细胞凋亡时,通过特定的途径激活,最终形成酶级联放大效应,上游 caspase(如 caspase - 9)的激活是整个级联反应的关键^[13]。既往研究显示在紫外线诱导人角质细胞凋亡过程中存在 caspase - 9 的激活^[14]。本研究结果分析显示经冬凌草甲素诱导后 GBC - SD 细胞的 caspase - 9 酶原被激活,且随着给药浓度的升高活化水平逐渐增强。caspase - 3 是下游关键的执行分子,它在凋亡信号转导的许多途径中发挥功能,活化的 caspase - 9 通过酶级联反应激活下游 caspase(如 caspase - 3),最终形成 caspase - 9 -

caspase-3 活化复合物,引起细胞凋亡^[13]。本研究通过流式细胞仪检测 caspase-3 活性随着药物浓度增加逐渐增强,56μmol/L 组 caspase-3 活性是对照组的 11 倍。

综上所述,冬凌草甲素能诱导人胆囊癌 GBC-SD 细胞发生凋亡,其机制可能与细胞线粒体膜电位改变和 caspase-9、caspase-3 的激活密切相关。以上研究结果为进一步深入研究冬凌草甲素抗胆囊癌的分子机制提供了实验依据。

参考文献

- 1 刘净,谢韬,魏秀丽,等. 冬凌草化学成分的研究[J]. 中草药,2007,38(1):25-27
- 2 Ji Z, Tang Q, Zhang J, *et al.* Oridonin-induced apoptosis in SW620 human colorectal adenocarcinoma cells[J]. *Oncol Lett*,2011,2(6):1303-1307
- 3 Kang N, Zhang JH, Qiu F, *et al.* Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways[J]. *Cancer Lett*,2010,294(2):147-158
- 4 Li X, Li X, Wang J, *et al.* Oridonin up-regulates expression of P21 and induces autophagy and apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Int J Biol Sci*,2012,8(6):901-912
- 5 Gao FH, Liu F, Wei W, *et al.* Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in

- colorectal cancer cells[J]. *Int J Mol Med*,2012,29(4):649-655
- 6 Zhang YH, Wu YL, Tashiro S, *et al.* Reactive oxygen species contribute to oridonin-induced apoptosis and autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2011,32(10):1266-1275
- 7 Li J, Yang L, Wu H. Oridonin induced the apoptosis of PC-3 cells and its mechanism[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*,2011,36(8):754-759
- 8 方敏,王晓东. 细胞凋亡的线粒体通路[J]. 北京大学学报:医学版,2002,34(1):1-10
- 9 谢晓原,陈俊辉,王少彬,等. 冬凌草甲素诱导人食管癌 SHEE 细胞凋亡及其线粒体改变[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(6):907-910
- 10 季宇彬,江剑,高世勇. 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制研究[J]. 中草药,2011,42(10):2051-2055
- 11 Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(3):E41-E43
- 12 刘宇,季宇彬. 肿瘤细胞的凋亡及其分子机制研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2008,24(5):524-527
- 13 朱炎杰,高维娟. Cyt-C 与 caspase 在细胞凋亡中的作用及相互关系[J]. 中国老年学杂志,2011,31(15):2990-2992
- 14 Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF. Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes[J]. *J Biol Chem*,2002,277(22):19346-19352

(收稿日期:2012-09-13)

(修回日期:2012-10-11)

慢性乙肝病毒感染者肝组织学与临床资料的比较

王 伟 杨 方 张明香 魏 倪

摘 要 目的 研究慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者的肝组织学改变与临床资料的关系。**方法** 对 259 例慢性 HBV 感染者行肝活检及临床相关检查。分析病理与临床诊断的一致性,按病理诊断携带者、CHB 分组以及组织学是否 $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ 分组,对患者临床资料,包括社会学、生化学、病毒学、纤维化血清学、影像学资料与组织病理学资料比较。**结果** 病理及临床诊断总体一致性欠佳($Kappa = 0.273, P < 0.01$),尤其以携带者的诊断符合率最低(36/144,25%),但在 CHB 的临床分度方面有较好的符合率(66.7%~86.2%)。分组比较显示:CHB 组较携带组饮酒者以及 ALT、TBil 升高者居多(P 分别为 0.010、0.001、0.023),HA、PCⅢ、 γ 球蛋白水平增高(P 分别为 0.036、0.002、0.032),而 HBVDNA 水平降低($P = 0.010$);组织学 $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ 组较 $< G_2$ 或 $< S_2$ 组年龄大($P < 0.001$),饮酒者、男性、具家族史者居多(P 分别 < 0.001 、0.006、0.026),ALT、TBIL 升高及 WBC 降低者居多(P 分别 < 0.001 、0.005、0.023),HA、PCⅢ、 γ 球蛋白水平增高,脾脏面积增大,而 HBV DNA、HBsAg 水平降低。ROC 曲线分析显示脾面积和 PCⅢ的诊断界值分别为 25.15cm²、102.45μg/L,敏感度为 70.7%、69.8%,特异性为 67.9%、71.5%。**结论** 慢性 HBV 感染者的组织学与临床诊断总体一致性欠佳,以携带者最显著;脾面积 ≥ 25.15 cm²或 PCⅢ ≥ 102.45 μg/L 者,应更慎重地全面评估病情,肝组织活检的意义更大,以免延误治疗时机。

关键词 慢性乙型肝炎 组织学 临床 诊断